

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 4 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460400

研究課題名(和文) ヒストンアセチル化酵素Hbo1 によるエストロゲン受容体のユビキチン化促進の解析

研究課題名(英文) Analysis on promoted ubiquitination of estrogen receptor by histone acetyltransferase Hbo1

研究代表者

飯塚 真由 (Iizuka, Masayoshi)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：20232118

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：乳がんの3分の2は、エストロゲンホルモンの影響で増殖し、そのホルモン作用の阻害薬が、乳がん治療に効果を挙げた。しかしながら、その薬が効かなくなることがあり、乳がんの治療の妨げとなっている。エストロゲンホルモンの作用は、細胞内のエストロゲン受容体とその増殖シグナルを細胞内に伝える。乳がんを分子的に理解するためには、エストロゲン受容体が細胞内でどのように産生され、分解されるか、細胞内での同在を変えるのか、徹底的に解明する必要がある。エストロゲン受容体がHbo1というクロマチンを修飾する酵素によって、直接ユビキチン化されて分解を受けるといふ、新しい分子機構を今回発見した。

研究成果の概要(英文)：Approximately two thirds of breast cancers grow in an estrogen-dependent fashion. Hormonal therapy, which inhibits estrogen action, has been proven effective in treatment of those breast cancers. However, resistance to such therapies often arises, complicating treatment of breast cancer patients. Estrogen signal for proliferation is transmitted into cell via estrogen receptor. Thus, it is of importance to understand fully molecular mechanism of how estrogen receptor is produced, degraded, or transferred within the cell. I have found a novel mechanism of how estrogen receptor protein is degraded: histone acetyltransferase Hbo1, involved in DNA replication, ubiquitinates estrogen receptor directly and stimulates ubiquitin-dependent proteasomal degradation. This degradation of estrogen receptor appears to contribute to cycled DNA binding and proteolysis of estrogen receptor, leading to continued activation of estrogen-dependent transcription.

研究分野：生化学 分子腫瘍学 クロマチン

キーワード：ユビキチン化 エストロゲン受容体

1. 研究開始当初の背景

申請者は、1999年にDNA複製開始に関与するヒストンアセチル化酵素 Hbo1 を世界に先駆けて単離した (Iizuka and Stillman JBC 1999)。それ以来、申請者らは、Hbo1 が複製のライセンス(一回の細胞周期で一回しかDNA複製が起こらないこと)に普遍的に必要であること (Iizuka et al. MCB 2006)、ストレスに際し蓄積されたがん抑制遺伝子産物 p53 が、Hbo1 のヒストンアセチル化酵素活性を負に制御することによって複製開始を阻害することを、明らかにしてきた (Iizuka et al. MCB 2008)。加えて申請者らは、Hbo1 がヒトのがんで過剰発現していることを発見した (Iizuka et al. Gene 2009)。このように、申請者は、Hbo1 研究の先駆者として、一貫して Hbo1 研究を推進してきた。さらに申請者らは、Hbo1 が、ユビキチンプロテアソーム系を介した ER α タンパク質の不安定化に寄与するという新規の機能を持つことを最近発見し (Iizuka et al. Cancer Science 2013)、その結果、以下のことが明らかとなった。

- (1) Hbo1 は ER α と相互作用し、Hbo1 は ER α を試験管内でアセチル化する。
- (2) MCF-7 細胞で Hbo1 を発現抑制すると、ER α タンパク質が安定化する。
- (3) 外来性に導入された Hbo1 は、ユビキチンの 48 番目のアミノ酸を介した ER α のユビキチン化を促進する。
- (4) Hbo1 のヒストンアセチル化酵素活性と、ER α に対するユビキチン化能は関連している。しかしながら、Hbo1 が ER α タンパク質のユビキチン化を促進する詳細な分子機構は不明である。

2. 研究の目的

上述した研究背景と研究成果をもとに、Hbo1 が ER α タンパク質のユビキチン化をどのようにして促進するのか、その分子機構を解明し、ER α のタンパク質安定性、翻訳後制御の理解を深めるのが本研究の目的である。研究期間内に以下のことを明らかにすることを目標とした。

- (1) ER α の欠失変異、リシンの置換変異を作製する。
- (2) 作製された ER α 変異体が、哺乳類細胞において、Hbo1 によってユビキチン化されるかどうか検討する。
- (3) (1)と(2)の実験結果から、Hbo1 による ER α のユビキチン化の部位を決定し、Hbo1 が ER α タンパク質のユビキチン化を促進する機

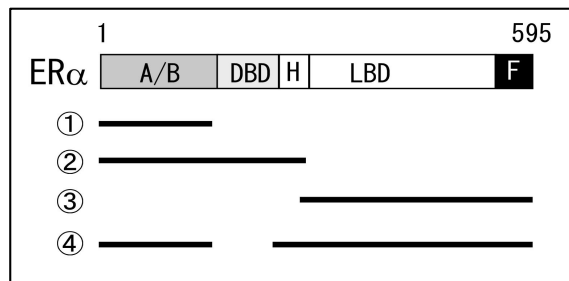
構に関する仮説を検証する。

- (4) 試験管内で Hbo1 が ER α タンパク質をユビキチン化するかどうか検討する。

3. 研究の方法

- (1) ER α の欠失変異体の作製

ER α アミノ酸配列中、アセチル化あるいはユビキチン化を受け得るリシン残基は、A/B ドメイン(アミノ酸:1-179)に4か所、DNA結合ドメイン(アミノ酸:180-268)に10か所、リガンド結合ドメイン(アミノ酸:299-595)に15か所ある。ER α の欠失変異体を作製した。
 欠失変異体 ER α A/B (1-179 アミノ酸)
 欠失変異体 ER α LBD (1-298 アミノ酸)
 欠失変異体 ER α LBD (282-595 アミノ酸)
 欠失変異体 ER α DBD (1-179 + 269-595 アミノ酸)



DBD: DNA 結合ドメイン; H: ヒンジ領域; LBD: リガンド結合ドメイン

- (2) ER α の点突然変異体の作製

ユビキチン化の部位がせめられたら、その領域に絞って、リシン アルギニン変異体 (KR 変異) を作製した。

- (3) ER α 変異体のユビキチン化のアッセイ

ER α 欠失変異体を、ユビキチン、Hbo1 とともに 293T 細胞で共発現後、変性剤存在下で、ER α のタグに対する抗体で ER α を免疫沈降し、ユビキチンのタグ抗体でウェスタン解析することで、ユビキチン化のアッセイを行った。

- (4) Hbo1 自体がユビキチンリガーゼ活性を持つ可能性の検討

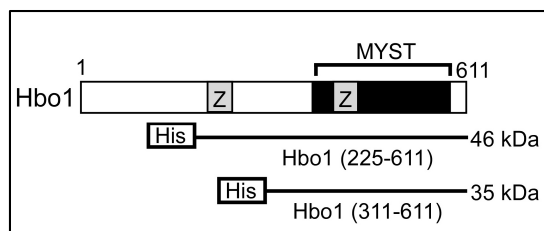
Hbo1 は、Zinc フィンガー様配列を2個持ち、RING 型ユビキチンリガーゼの亜型とも考えられる。Hbo1 タンパク質を用いて、in vitro で ER α を基質としてユビキチン化アッセイを行った。

4. 研究成果

- (1) Hbo1 による ER α のユビキチン化部位の決定
ER α のカルボキシル末端に位置するリガンド

た結合ドメイン(LBD; アミノ酸 : 304-554)が、Hbo1 によって強くユビキチン化の促進を受けた。(2) LBD 内の 11 か所すべてのリシン残基をアルギニン残基に置換した変異体でも Hbo1 によってユビキチン化が促進された。さらに、4 か所のシステイン残基をアラニン残基に置換した変異体でも Hbo1 によってユビキチン化が促進された。以上から、ER の LBD の特定の アミノ酸残基にユビキチン化が起こるといふよりむしろ、あるアミノ酸残基にユビキチン化が起こらなければ、別のアミノ酸残基にユビキチン化が生ずるようなメカニズムが働いているようである。

(2) Hbo1 の内在性 E3 リガーゼ活性
組換え Hbo 1 タンパク質が自分自身を基質としてユビキチン化するかどうか、異なる E2 を用いてアッセイした。UbcH5c を E2 として使うと、高分子のユビキチン化したタンパク質産物を認め、Hbo1 自体にユビキチン化活性化能があることがわかった。ヒストンアセチル化酵素ドメインを含む MYST ドメインに自己ユビキチン化活性をマップすることができた。すなわち下図の Hbo1 (225-611) は、自己ユビキチン化能を有していた。



(3) ER α に対する Hbo1 の E3 リガーゼ活性
試験管内で、組換え Hbo 1 タンパク質が ER α のリガンド結合ドメインを基質としてユビキチン化できるかどうか検討した。ATP、E1、E2、ユビキチンの存在下ではじめて、Hbo1 は ER α のリガンド結合ドメインをユビキチン化することができた。一方、Hbo1 の MYST ドメインだけでは、ER α のリガンド結合ドメインを基質としてユビキチン化することはできなかった。Hbo1 の N 末端部分が ER α のリガンド結合ドメインに必要なことが示唆された。

(4) エストラジオール-17 β の E3 活性への影響
リガンド結合ドメインがリガンドであるエストラジオール-17 β と結合できることから、Hbo1 のリガンド結合ドメインをユビキチン化への影響を検討した。Hbo1 による ER α ユビキチン化反応にエストラジオール-17 β を加えると、量依存的に、ユビキチン化反応を抑制した。

(5) Hbo1 の細胞内での ER α の代謝回転への影響
Hbo1 が細胞内で ER α の代謝回転に係るかどうかが調べる目的で、Hbo1 を siRNA で発現抑制し、エストロゲン存在有り無し条件下

で、ER α の発現レベルを調べた。エストロゲンの有無にかかわらず、Hbo1 の発現抑制は ER α の発現を増加させた。すなわち、リガンドの有無に関係なく、Hbo1 は ER α の不安定化に寄与することが示唆された。

(6) 転移性乳がんで見られる転写活性化能が亢進した ER α 変異体へのユビキチン化
ホルモン療法抵抗性乳がんで見いだされた ER α 変異体に対して、Hbo1 によるユビキチン化を検討した。野生型の ER α よりも、2 つの ER α 変異体 (Y375S および D538G) の方が、Hbo1 によって、より強くユビキチン化された。ER α は、DNA 結合 ユビキチン化 分解 DNA 結合のサイクルを繰り返しながら、転写活性を恒常的に高めることが知られるので、Hbo1 は変異 ER α のユビキチン化を高めることで、転写活性化能の恒常的亢進に寄与していることが示唆された。

(7) 研究成果の内外の位置づけ、展望
MYST ファミリーのヒストンアセチル化酵素は、ヒストン H4 をアセチル化することで、DNA 修復、白血病等の生命現象に深く関与することが知られている。本研究から MYST ドメインのタンパク質がユビキチン E3 リガーゼ活性を持つことが示唆される。いままではヒストンアセチル化酵素に由来すると考えられていた機能が、実はユビキチン化酵素活性に由来する可能性があり、クロマチン研究領域に対するインパクトは大きい。将来的に、MYST ファミリーヒストンアセチル化酵素の新しい機能が発見される可能性がある。

5 . 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

Iizuka M, Susa T, Tamamori-Adachi M, Okinaga H, Okazaki T. Intrinsic ubiquitin E3 ligase activity of histone acetyltransferase Hbo1 for estrogen receptor α . *Proceedings of the Japan Academy, Ser. B in press* (査読有)
http://www.japan-acad.go.jp/en/publishing/pja_b.html

Uchida K, Tanaka Y, Ichikawa H, Watanabe M, Mitani S, Morita K, Fujii H, Ishikawa M, Yoshino G, Okinaga H, Nagae G, Aburatani H, Ikeda Y, Susa T, Tamamori-Adachi M, Fukusato T, Uozaki H, Okazaki T, Iizuka M. An excess of CYP24A1, lack of CaSR, and a novel lncRNA near the PTH gene characterize an ectopic PTH-producing tumor.

J. Endocr. Soc. js.2017-00063. (査読有)
<https://doi.org/10.1210/js.2017-00063>

Susa T, Ikaga R, Kajitani T, Iizuka M, Okinaga H, Tamamori-Adachi M, Okazaki T. Wild-type and specific mutant androgen receptor mediates transcription via 17 β -estradiol in sex hormone-sensitive cancer cells. *J Cell Physiol.* 230:1594-606, 2015. (査読有)
DOI:10.1002/jcp.24906

Fujii H, Tamamori-Adachi M, Uchida K, Susa T, Nakakura T, Hagiwara H, Iizuka M, Okinaga H, Tanaka Y, Okazaki T. Marked cortisol production by intracrine ACTH in GIP-treated cultured adrenal cells in which the GIP receptor was exogenously introduced. *PLoS One.* 9:e110543, 2014. (査読有)
DOI:10.1371/journal.pone.0110543

[学会発表](計6件)

飯塚真由、諏佐崇生、安達(玉盛)三美、岡崎具樹、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ Hbo1 は、エストロゲン受容体に対する E3 リガーゼ活性を持つ、第 39 回生物学会年会、2016 年 12 月 1 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
飯塚真由、ヒストンアセチル化酵素 Hbo1 によるエストロゲン受容体のユビキチン化はエストロゲンによって阻害される、第 75 回日本癌学会学術総会、2016 年 10 月 7 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
飯塚真由、諏佐崇生、安達(玉盛)三美、岡崎具樹、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ Hbo1 によるエストロゲン受容体タンパク質の非定型的ユビキチン化、第 38 回生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同年会、2015 年 12 月 2 日、神戸ポートピアアイランド(兵庫県・神戸市)
飯塚真由、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ Hbo1 による、エストロゲン受容体タンパク質の非定型的ユビキチン化、第 74 回日本癌学会学術総会、2015 年 10 月 9 日、名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)
飯塚真由、岡崎具樹、安達(玉盛)三美、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ Hbo1 によるエストロゲン受容体タンパク質のユビキチン化部位の同定、第 37 回生物学会年会、2014 年 11 月 25 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
飯塚真由、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ Hbo1 によるエストロゲン受容

体タンパク質のユビキチン化の機構解明に向けて、第 73 回日本癌学会学術総会、2014 年 9 月 27 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者
飯塚 真由 (IIZUKA, Masayoshi)
帝京大学医学部・生化学講座・教授
研究者番号：20232118

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
()